

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° d publication : 2 685 347

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 91 16215

(51) Int Cl⁵ : C 12 P 21/02, C 12 N 15/70, C 07 K 3/20

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 23.12.91.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 25.06.93 Bulletin 93/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE LOUIS PASTEUR,
U.L.P. Etablissement public à caractère scientifique,
culturel et professionnel — FR.

(72) Inventeur(s) : Obrecht Gauthier, Lefèvre Jean-
François et Meyrueis Patrick.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Metz Patni.

(54) Procédé biotechnologique d'obtention et de production microbienne d'oligomères peptidiques comme substitués de la gélatine.

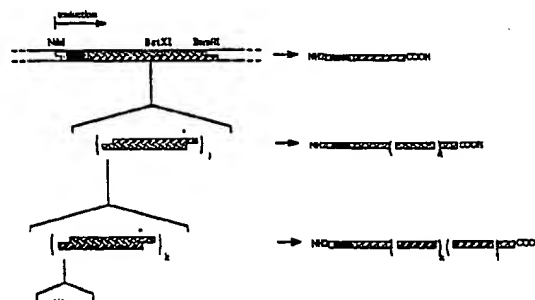
(57) Procédé biotechnologique d'obtention et de production
d'oligomères peptidiques comme substitués de la gélatine,
caractérisé en ce que :

. on insère dans un vecteur d'expression intracytoplasmique des séquences à exprimer ordonnées comportant les éléments suivants :

- une séquence de sélectivité spécifique permettant la récupération ultérieure du produit d'expression ;
- une séquence d'expression d'un peptide du type gélatine ;

. on réalise le clonage et l'expression sur des souches d'E.Coli ;

. on récupère le produit d'expression.



□ f-Met-Cys □ (Gly-X-Y)_n
■ Phe-His-His □ (Gly-X-Y)₁
▨ Leu-Met □ (Gly-X-Y)₂

FR 2 685 347 - A1



La présente invention se rapporte à un procédé biotechnologique de production microbienne d'oligomères peptidiques comme substituts de la gélatine.

5 De nombreux produits et matériaux ont été conçus à partir de la gélatine, suite à la découverte de ses propriétés. On les trouve dans des domaines aussi divers que l'alimentation, la photographie et l'imprimerie, l'industrie pharmaceutique, l'holographie. Certaines applications associent de plus la
10 capacité de la gélatine à interagir avec des agents extérieurs comme l'alun de chrome ou le glutaraldéhyde.

Mais, en dépit des nombreux travaux réalisés en rhéologie sur la gélatine, ce matériau présente des
15 difficultés d'utilisation, liées à son hétérogénéité. Ainsi, en holographie par exemple, les conditions de couchage de la gélatine sur le support et le traitement de révélation de l'image sont très variables et nécessitent une nouvelle mise au point à chaque fois
20 que l'on change de lot de gélatine.

De même, il n'est pas possible d'en étudier strictement les propriétés physico-chimiques.

Cette hétérogénéité des propriétés de la gélatine résulte de son origine et de ses conditions
25 d'obtention.

En effet, on obtient la gélatine de manière classique à partir de tissu animal, où elle représente, sous forme de collagène de type I, 30 % des protéines totales.

30 La structure du collagène de type I est connue. Il s'agit d'un arrangement compact de chaînes protéiques.

Deux types de chaînes, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de 1056 aminoacides (aa) chacune, forment une triple-hélice
35 $(\alpha 1)_2\alpha 2$ ou $(\alpha 1)_3$. 1014 aa participent à cette triple-hélice longue de 280 nm. A chaque extrémité, une vingtaine d'aa sont structurés différemment (les

télopeptides). D'autre part, avant l'assemblage en triple-hélice, chaque chaîne comporte 100 à 200 aa supplémentaires à chaque extrémité, qui permettent la mise en registre des chaînes. Ces aa sont éliminés une
5 fois la triple-hélice formée. Ces filaments de triple-hélice s'associent côte à côte de façon décalée pour donner une fibre (diamètre : 5 à 10 microns).

Les interactions qui permettent le maintien de cette structure découlent directement de la
10 particularité de la séquence en aa des chaînes. L'homologie de séquence entre les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est de 67 % dans la partie en triple-hélice. Ces valeurs sont calculées d'après les séquences des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I bovin sur 856 aa de la partie
15 en triple-hélice (P.Bornstein and W.Traub, "The Proteins", H.Neurath et R.H.Hill éditeurs, Academic Press, 1975).

Cette séquence comporte 1/3 de glycines et 1/4 à 1/5 de prolines disposées de façon à obtenir une
20 suite de triplets (Gly-X-Y)_n où X est fréquemment une proline. Les contraintes apportées par la proline et l'absence de chaîne latérale à la glycine permettent à la liaison peptidique Gly-Pro d'adopter une conformation de type *trans*. Chaque chaîne forme ainsi
25 une hélice gauche et peut s'associer avec deux autres chaînes en une triple-hélice droite. Des liaisons de type hydrogène stabilisent cette structure.

Les chaînes latérales des aa se trouvent à l'extérieur de cette triple-hélice. Certains résidus
30 portés par les chaînes latérales présentent des modifications chimiques qui vont permettre un pontage chimique inter-chaînes et intra-chaînes, qui s'établit au cours du vieillissement du tissu.

Il en résulte ainsi une structure finale
35 fibrillaire maintenue par des interactions physiques labiles et des interactions chimiques permanentes.

Le collagène d'origine animale ne présente

donc pas une structure stabilisée dans le temps.

Les procédés d'extraction et de purification du collagène sont très coûteux et entraînent une dénaturation partielle de la structure décrite précédemment.

La gélatine est le produit de l'extraction du collagène par des procédés peu coûteux. Deux méthodes sont employées : l'extraction en milieu acide et l'extraction en milieu alcalin. Dans les deux cas, il se produit une hydrolyse des chaînes. Le produit final obtenu est un amas de chaînes protéiques de taille variable, plus ou moins réticulées.

Ce matériau peut se trouver dans deux états, suivant la température.

A froid, le matériau revêt un aspect de gel résultant d'un réseau de chaînes associées en triple-hélice. Mais, les pontages chimiques étant toujours présents, les propriétés du gel ainsi obtenu sont une combinaison de propriétés de gels physiques et chimiques. D'autre part, les pontages étant dépendants de l'âge du tissu dont on a extrait la gélatine, ces propriétés sont variables et hétérogènes d'un lot de gélatine à l'autre.

A chaud, le réseau maintenu par les interactions non covalentes est détruit et l'aspect est liquide, bien utile à la manipulation du matériau.

On trouve un modèle décrivant ces différents états dans les travaux de W.Traub et K.A.Piez (Chemistry and structure of collagen, vol. 25, Academic Press, 1971) et dans les travaux de J.E.Jolley (Photographic science and engineering, vol.14 n°3, 1970).

On constate donc que si certaines de ses caractéristiques sont suffisamment intéressantes pour justifier son utilisation préférentielle, la gélatine obtenue par les méthodes connues à partir de collagène animal présente globalement de graves inconvénients qui

nuisent à un usage optimal de ce matériau.

Or, si l'on peut envisager d'autres matériaux susceptibles de remplacer la gélatine, ces autres matériaux présentent un intérêt nettement inférieur, notamment au niveau de la facilité de manipulation, comme mentionné ci-dessus, et également au niveau des performances optiques, en holographie par exemple.

On ne dispose donc pas de matériau qui soit à la fois utilisable dans les applications de la gélatine, et qui présente des propriétés physico-chimiques stables et homogènes.

La présente invention a pour but de répondre à ce besoin, en faisant produire par un microorganisme manipulé génétiquement, grâce à des procédés biotechnologiques, des peptides ayant un comportement similaire à la gélatine.

Un premier avantage de ce procédé réside dans la possibilité d'obtenir des produits homogènes et de résoudre ainsi les problèmes de reproductibilité cités précédemment.

Un second avantage est lié à la possibilité de moduler les fonctions chimiques présentes dans ces peptides en changeant les acides aminés qui constituent leur séquence, et donc de les adapter vis-à-vis des agents de traitement extérieurs (interactions avec la surface de couchage, fixateurs, plastifiants, etc...), ou en fonction de l'application à laquelle ils sont destinés.

Plus précisément, l'invention vise un procédé d'obtention et de production d'oligomères peptidiques comme substituts de la gélatine, caractérisé en ce que :

on insère dans un vecteur d'expression intracytoplasmique des séquences à exprimer ordonnées comportant les éléments suivants :

- une séquence de sélectivité spécifique permettant la récupération ultérieure du produit

d'expression ;

- une séquence d'expression d'un peptide du type gélatine ;

- 5 . on réalise le clonage et l'expression sur des souches d'E.Coli ;
- . on récupère le produit d'expression.

10 Selon une autre caractéristique de l'invention, le protocole de récupération du produit d'expression comprend une étape de purification par rétention sélective sur un support par affinité, suivie d'une dégradation pour l'obtention du produit pur.

15 Les caractéristiques techniques et d'autres avantages de l'invention sont consignés dans la description qui suit, effectuée à titre d'exemple non limitatif sur un mode d'exécution en référence aux dessins accompagnants dans lesquels :

- . la figure 1 est une représentation schématique du vecteur d'expression utilisé montrant le site d'insertion des séquences à exprimer ;
- 20 . la figure 2 est une vue synoptique présentant différentes stratégies d'insertion de séquences à exprimer ;
- . la figure 3 est une présentation de détail des séquences nucléotidiques employées ;
- 25 . la figure 4 est un diagramme fonctionnel détaillant les étapes du protocole de récupération du produit d'expression, dans le cas d'un produit d'expression soluble.

30 L'idée générale inventive consiste à insérer dans un vecteur d'expression une séquence codant pour un peptide du type gélatine, jointe à une séquence de sélectivité permettant la récupération ultérieure du produit d'expression, cette récupération s'effectuant par rétention sélective sur un support, suivie d'une
35 dégradation de la partie de sélectivité de la molécule de manière à obtenir le produit pur.

Le microorganisme choisi pour la production

dans l'exemple présenté est la bactérie *Escherichia Coli*, déjà employée dans des procédés de production de ce type. Son avantage réside dans un temps de division très court, un milieu nutritif peu onéreux, et des conditions de croissance aisées.

De nombreux protocoles de purification de protéines recombinantes exprimées chez *E. Coli* sont décrits. L'absence de système de modifications post-traductionnelles (glycosilation de résidus d'acides aminés) ne pose pas de problème dans le cas qui nous intéresse.

Le système vecteur d'expression / cellule hôte choisi (voir figure 1) est celui mis au point par A.H. Rosenberg et F.W. Studier (*Gene*, 56 (1987) 125-135) et commercialisé par la société Novagen sous le nom de pET (brevet US n° 4,952,496 déposé le 28 août 1990).

C'est actuellement un des systèmes les plus performants d'expression intracytoplasmique chez *E. Coli*, de par sa versatilité (possibilité d'outrepasser la toxicité des produits d'expression) et de par son niveau d'expression (utilisation de la RNA polymérase et du promoteur du phage T7).

La souche utilisée pour les clonages est HMS174 et la souche utilisée pour l'expression est B121(DE3)pLysS. Ces souches d'*Escherichia Coli* sont décrites dans les publications concernant le système d'expression et sont spécifiques au système pET. On peut toutefois imaginer d'employer un autre système vecteur d'expression / cellule hôte.

Les constructions génétiques ont été réalisées selon les protocoles décrits par T. Maniatis, E.F. Fritsch et J. Sambrook (*Molecular cloning-a laboratory manual*, CSH Lab. 1989). On pourra se référer à la figure 1. L'insertion se fait au niveau des sites BamH I et Nde I. Les oligonucléotides introduits dans le vecteur ont été obtenus par synthèse chimique.

La figure 2 résume le principe des constructions et la figure 3 indique les séquences oligonucléotidiques employées.

La stratégie mise en oeuvre consiste à
5 introduire dans la phase de lecture du vecteur pET une séquence comportant les éléments suivants :

- . une séquence codant pour un peptide de type gélatine. Cette séquence comporte préférentiellement un site de restriction à extrémités cohésives non palindromiques, permettant d'introduire des concatémères de
10 séquences nucléotidiques codant pour des peptides de type gélatine bordés d'extrémités cohésives compatibles à celles du site de restriction. A une des extrémités des séquences à concatémériser, la
15 séquence est modifiée en un nucléotide et n'est ainsi pas reconnue par l'enzyme de restriction après ligation des monomères entre eux ou au vecteur. Ceci permet d'introduire les monomères de façon orientée, d'en introduire un grand nombre, et d'alterner les
20 séquences introduites (séquences codant pour des peptides riches en triplets Gly-Pro-Ala suivies de séquences codant pour des peptides riches en triplets Gly-Glu-Arg par exemple).
- . trois codons qui se suivent codant pour des
25 histidines, qui permettent l'affinité avec une résine Nickel-NTA-agarose utilisée dans le protocole de récupération.
- . un codon codant pour une méthionine entre les codons His et les séquences codant pour les peptides de type
30 gélatine. Ceci permet suite à une dégradation chimique au bromure de cyanogène au niveau de la Met de ne conserver que le produit final sous la forme $(\text{Gly-X-Y})_n$. Les triplets d'aa codés par les séquences à concatémériser sont des triplets caractéristiques
35 des structures en hélice du collagène.
- . un codon codant pour une cystéine, de façon à pouvoir greffer les produits d'expression sur une résine

chromatographique ou sur une protéine. Dans les applications conduisant au peptide pur, ce codon peut être différent ou inexistant.

- 5 . la présence d'un codon Leu entre les codons His et le codon Met est due à la spécificité du site de restriction qu'il comporte. si on change de site de restriction, ce codon peut lui aussi être différent, voire inexistant.

10 La séquence ainsi construite, codant pour fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met constitue une séquence de sélectivité, permettant la récupération ultérieure du produit. La présence de cette séquence de sélectivité jointe à la séquence d'expression a permis d'uniformiser le protocole de récupération.

15 Notamment, la présence des trois codons successifs codant pour des histidines permet une purification par rétention spécifique par affinité sur un gel de chromatographie Nickel-NTA-Agarose (cette résine est commercialisée par Qiagen Inc., USA-Canada).

20 Dans une réalisation préférée, les séquences introduites permettant de préparer le vecteur à accepter les multimères sont des séquences codant pour fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Lys-Gly-Trp-Met-STOP.

25 Plus précisément, on choisit par exemple la séquence nucléotidique suivante :

T ATG TGC CAT CAC CAT CTT ATG GGT CCA GCT GGT GAA CGT G
GTCCA AAA GGT TTG ATG TAA G.

30 Cette séquence contient un site BstX I qui est un site de restriction à extrémités cohésives non palindromiques.

Comme mentionné ci-dessus, on pourra alors insérer en BstX I des séquences concatémères, par exemple codant pour les séquences suivantes riches en Gly-Pro-Ala :

35 Trp-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Lys-Gly

ou riches en Gly-Glu-Arg :

Trp-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Glu-Arg-Pro-Lys-Gly.

Notamment, les séquences nucléotiques
5 insérées en BstX I correspondant aux exemples ci-dessus
pourront être :

T TGG CCA GGT CCA GCT GGT CCA GCT GGT GAA CGT GGT CCA GC
T GGT CCA GCT GGT CCT AAA GG

ou :

10 T TGG CCA GGT GAA CGT GGT GAA CGT GGT CCA GCT GGT GAA CG
T GGT GAA CGT GGT CCT AAA GG.

Dans ces exemples, la séquence reconnue par
BstX I est CCA NNN NNN TGG, la séquence modifiée ,et de
ce fait non reconnue par BstX I, est CCT NNN NNN TGG.

15 Le fait que la séquence choisie pour le site
BstX I est non palindromique permet d'orienter les
monomères lors de la ligation.

D'autre part, on a toujours un site unique
BstX I dans le vecteur après insertion des
20 concatémères. En effet, les séquences introduites sont
modifiées à une de leurs extrémités, la modification
d'un nucléotide entraînant la non-reconnaissance du
site par l'enzyme BstX I.

Ces modes de réalisation préférés sont
25 reproduits en détail sur les figures 2 et 3.

Une autre construction peut être réalisée, où
la séquence codant pour fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met
est remplacée par une séquence codant pour fMet-Cys-
His-His-His-Leu-Met-Cys-His-His-His-Leu-Met.

30 Par exemple, on pourra avoir la séquence
nucléotidique suivante :

T ATG TGC CAT CAC CAT CTT ATG TGC CAT CAC CAT CTT ATG.

Cette variante, dans laquelle, comme on peut
le voir, la séquence de sélectivité initiale est
35 répétée deux fois, permet d'augmenter l'affinité du
peptide exprimé pour la résine Nickel-NTA-agarose.
L'intérêt est de pouvoir ainsi purifier des produits

d'expression qui seraient insolubles, en présence d'un agent dénaturant comme le chlorure de guanidine.

Bien entendu, la stratégie de construction de la séquence de sélectivité peut être aménagée suivant d'autres variantes. Ainsi, on peut insérer plus ou moins de codons codant pour l'histidine, et/ou répéter la séquence de sélectivité plusieurs fois, en fonction des besoins de sélectivité au niveau de la phase de récupération.

10 A partir des constructions précédentes des séquences de sélectivité et d'expression, on peut insérer d'autres séquences nucléotidiques, dont les produits d'expression ne sont pas similaires aux séquences de la structure en hélice du collagène, par exemple :

- 15 . introduction d'un gène d'enzyme ou d'un fragment de ce gène devant les séquences concatémérisées décrites précédemment, de façon à obtenir un produit final de fusion. Le produit final obtenu, (enzyme)-(Gly-X-Y)_n ou (fragment d'enzyme)-(Gly-X-Y)_n peut être directement utilisé comme molécule immobilisée grâce aux propriétés de la séquence (Gly-X-Y)_n.
- 20 . introduction d'une séquence codant pour un peptide ayant une affinité pour un ion métallique devant les séquences concatémérisées décrites précédemment. Le produit final obtenu, (site d'affinité avec un métal)-(Gly-X-Y)_n est particulièrement intéressant dans une application comme l'holographie en gélatine dichromatée. Il permet de contrôler quantitativement et de façon reproductible l'interaction entre le chrome réduit par la lumière et la matrice gel.
- 25
- 30

Le protocole de récupération du produit exprimé est de conception spécifique. Selon une caractéristique de l'invention, ledit protocole est uniforme, quelle que soit la structure de la séquence à exprimer insérée dans le vecteur d'expression. La description du protocole est effectuée en référence au

35

diagramme de la figure 4.

Une fois que les constructions ont été introduites dans le vecteur d'expression, la souche d'expression E.Coli B121(DE3)plysS est transformée par le vecteur.

Les bactéries en possession du vecteur d'expression sont sélectionnées sur un milieu de culture supplémenté en Ampicilline. Elles sont alors transférées en milieu de culture liquide LB contenant de l'Ampicilline et l'expression est induite par introduction d'IPTG à la concentration finale de 100 μ M dans le milieu.

On récupère le produit exprimé par une purification, suivie d'une dégradation afin d'éliminer la séquence de sélectivité.

La purification des produits exprimés est réalisée en deux phases. Le procédé employé présente l'avantage d'être uniforme à tous les produits exprimés, d'avoir un rendement élevé et d'être constitué de peu d'étapes.

La première phase est une clarification du lysat bactérien. Après récolte des bactéries induites sous forme d'un culot de cellules et lyse de ces cellules, le contenu cytoplasmique soluble est récupéré dans un tampon aqueux par une étape de centrifugation.

Cette fraction soluble est chauffée pendant une heure à 60°C de façon à précipiter la plupart des protéines bactériennes par dénaturation.

Une nouvelle centrifugation permet de collecter la fraction soluble non précipitée où se trouve le produit d'expression.

L'extrait obtenu est utilisé pour la phase de purification proprement dite sur une résine Nickel-NTA-agarose. A pH basique, le peptide à purifier est retenu spécifiquement sur la résine. Il est séparé des molécules contaminantes de l'extrait par une suite de lavages en tampon aqueux basique.

L'élution du peptide est ensuite réalisée par un lavage avec un tampon aqueux acide.

5 Dans le cas d'un produit d'expression se trouvant exprimé sous forme insoluble, l'utilisation de la variante décrite plus haut, dans laquelle le vecteur exprime 6 His adjacentes, permet de purifier le peptide sur Ni-NTA-agarose à partir du culot, solubilisé en présence d'un détergent.

10 Le protocole de purification comprend alors dans cette variante la lyse des bactéries, suivie d'une centrifugation et d'un lavage du culot contenant les débris cellulaires et les agrégats insolubles à l'aide de détergents (Triton X-100).

15 La solubilisation des corps d'inclusion contenant le produit d'expression est effectuée à l'aide d'un agent dénaturant tel que le 6M guanidinium-HCl. Le peptide est ensuite purifié sur Ni-NTA-agarose en présence de l'agent dénaturant. L'agent dénaturant est éliminé par la suite par dialyse.

20 Le peptide obtenu à la suite de la purification possède à son extrémité une cystéine, ce qui permet de le greffer sur une protéine comme l'ovalbumine ou l'albumine sérique bovine par un réactif hétérobifonctionnel comme le MBS (Pierce
25 product n° 22310). Injecté à un lapin, ce peptide couplé permet d'obtenir des anticorps spécifiques anti-peptide.

30 Le peptide peut également être greffé sur une résine chromatographique activée pour la fixation des cystéines (par exemple Sulfo-LinkTM coupling gel, Pierce product n° 44895), et donner ainsi une résine utilisable pour la purification par affinité.

35 Afin de ne conserver que la partie en triplets $(\text{Gly-X-Y})_n$ ou les produits de fusion décrits dans le principe des constructions génétiques, on procède à la dégradation du produit après purification.

Le peptide est coupé au niveau des

méthionines par action de bromure de cyanogène pour éliminer la partie codée par la séquence de sélectivité.

5 Il est ensuite purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une résine C8, comme Aquapore RP300 (Pierce). Les fractions éluées contenant le peptide sont dessiquées sous vide, ce qui permet d'éliminer les solvants organiques volatils utilisés dans ce procédé chromatographique.

10 Le produit final a un degré de pureté très élevé si l'on en juge par les résultats de son analyse en acides aminés, son électrophorèse, son spectre UV et de dichroïsme circulaire, son spectre en RMN.

15 Il est bien entendu qu'au-delà des moyens décrits, diverses modifications évidentes et variantes simples entrent dans le cadre de la présente invention.

REVENDECATIONS

1. Procédé d'obtention et de production d'oligomères peptidiques comme substituts de la
5 gélatine, caractérisé en ce que :

. on insère dans un vecteur d'expression intra-cytoplasmique des séquences à exprimer ordonnées comportant les éléments suivants :

10 - une séquence de sélectivité spécifique permettant la récupération ultérieure du produit d'expression ;

- une séquence d'expression d'un peptide du type gélatine ;

15 . on réalise le clonage et l'expression sur des souches d'E.Coli ;

. on récupère le produit d'expression.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité comprend une séquence de purification du produit
20 d'expression et une séquence de dégradation pour l'obtention du produit pur.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité est répétée afin d'améliorer la récupération du produit
25 d'expression.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité comprend un ou plusieurs codons successifs codant pour des histidines, suivis d'un codon codant pour une
30 méthionine.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité débute par un codon codant pour une cystéine de façon à pouvoir greffer le produit
35 d'expression sur une résine ou une protéine, ledit produit ayant été récupéré avant dégradation.

6. Procédé selon la revendication 1,

caractérisé en ce que la séquence codant pour un peptide de type gélatine comporte un site de restriction non palindromique, et en ce qu'on introduit de façon orientée un ou des monomères ou concatémères de séquences codant pour des peptides de type gélatine bordés du même site de restriction de façon à obtenir un peptide complexe aux caractéristiques désirées.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on

10 introduit un gène ou un fragment de gène d'enzyme parmi la ou les séquences concatémérisées codant pour un peptide de type gélatine, de façon à obtenir un produit du type (enzyme)-peptide ou (fragment d'enzyme)-peptide directement utilisable comme enzyme immobilisée.

15 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on introduit une séquence codant pour un site d'affinité pour un ion métallique parmi la ou les séquences codant pour un peptide de type gélatine, de façon à obtenir un produit du type peptide-(site d'affinité pour un métal).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité est une séquence codant pour :

fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met.

25 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence de sélectivité est une séquence codant pour : fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met-Cys-His-His-His-Leu-Met.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que le site de restriction non palindromique est un site BstX I.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les séquences insérées permettant l'introduction de séquences monomères ou concatémères codant pour des peptides de type gélatine sont des séquences codant pour :

fMet-Cys-His-His-His-Leu-Met-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-

Gly-Pro-Lys-Gly-Trp-Met-STOP.

13. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la récupération du produit d'expression comprend une étape de purification par
5 rétention sélective sur un support par affinité, suivie d'une dégradation de la partie de sélectivité pour l'obtention du produit pur.

14. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce qu'on réalise l'étape de
10 purification par rétention sur une résine Nickel-NTA-Agarose, et la dégradation au bromure de cyanogène.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le protocole de récupération du produit d'expression est
15 le suivant :

- . récupération du culot de bactéries,
- . lyse du culot en tampon aqueux,
- . clarification par centrifugation,
- . chauffage de la fraction soluble,
- 20 . nouvelle centrifugation,
- . rétention et lavage sur une résine Nickel-NTA-Agarose,
- . élution,
- . dégradation au bromure de cyanogène,
- 25 . chromatographie en phase inverse,
- . dessiccation.

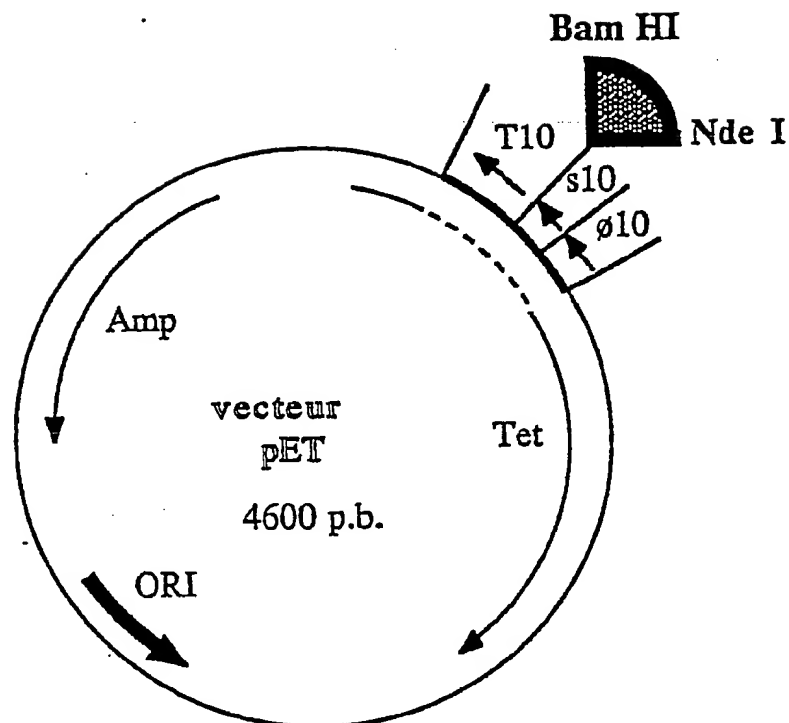
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le chauffage de la fraction soluble s'effectue pendant une heure à 60°.

30 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le protocole de récupération est le suivant pour permettre la récupération d'un produit exprimé insoluble :

- . récupération du culot de bactéries,
- 35 . lyse du culot en tampon aqueux,
- . centrifugation,
- . lavage du culot à l'aide de détergents,

- . solubilisation des corps d'inclusion par un agent dénaturant,
 - . rétention et lavage sur une résine Nickel-NTA-Agarose,
 - 5 . élution,
 - . dialyse pour l'élimination de l'agent dénaturant,
 - . dégradation au bromure de cyanogène,
 - . chromatographie,
 - . dessiccation.
- 10 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le vecteur d'expression utilisé est le plasmide connu sous le nom de pET.
- 15 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les souches d'E.Coli utilisées sont HMS174 pour le clonage et B121(DE3)pLysS pour l'expression.
- 20 20. Vecteur d'expression intracytoplasmique caractérisé en ce qu'il contient des séquences à exprimer selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

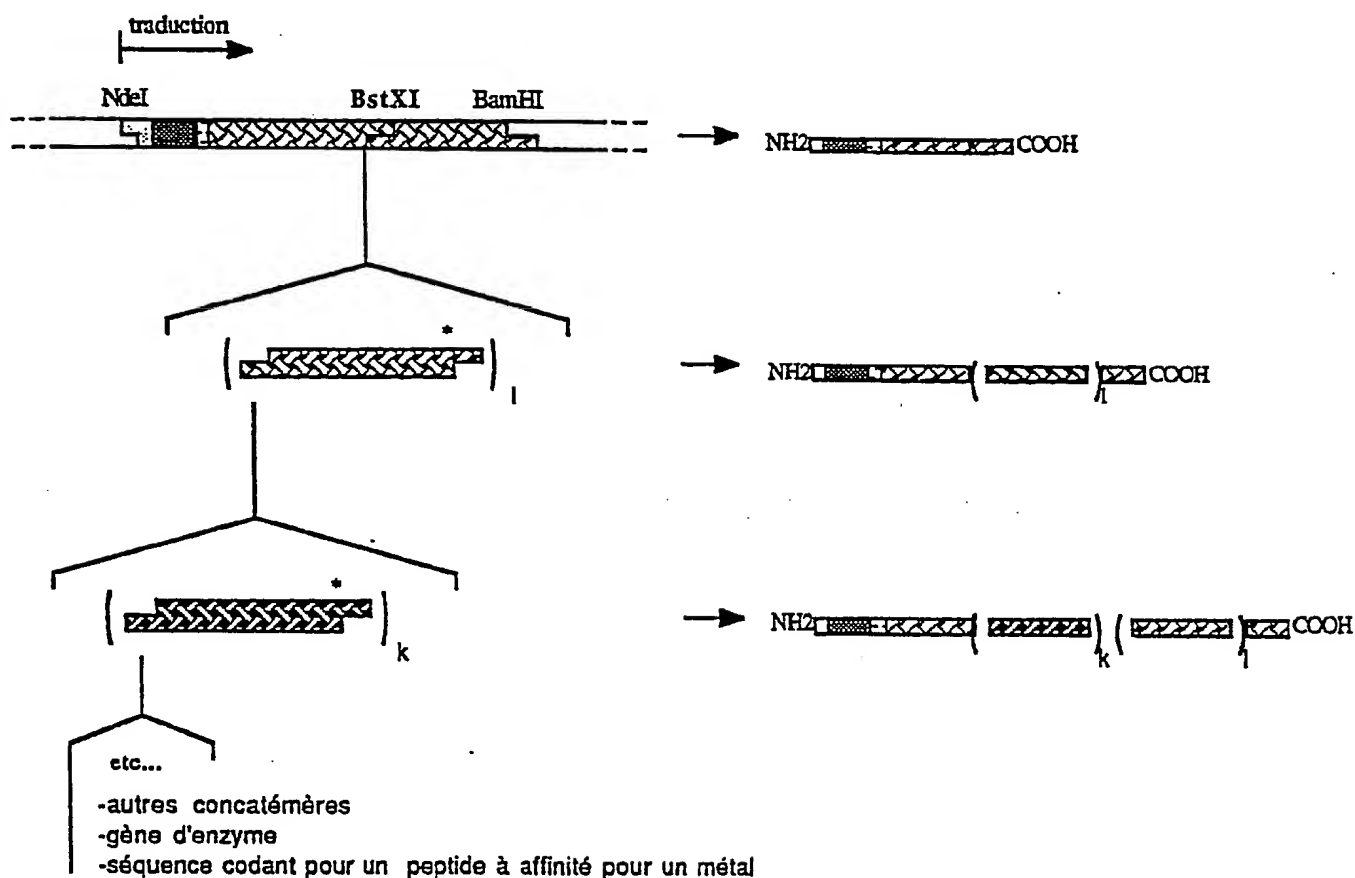
FIG. 1



- | | |
|-----|---|
| ORI | origine de replication |
| Amp | gène de résistance à l'ampicilline |
| Tet | gène de résistance à la tétracycline (détruit) |
| ø10 | séquence promotrice du gène 10 du phage T7 |
| s10 | séquence du démarrage de la traduction |
| T10 | séquence terminatrice de transcription du gène 10 du phage T7 |
| → | sens de la transcription et traduction des gènes |
| ◼ | zone d'insertion des séquences à exprimer |

FIG. 2

SEQUENCES EN ADN (double brin) \longrightarrow PRODUITS D'EXPRESSION (peptides)



* nucléotide modifié ne permettant pas la reconnaissance de la séquence par l'enzyme BstXI.

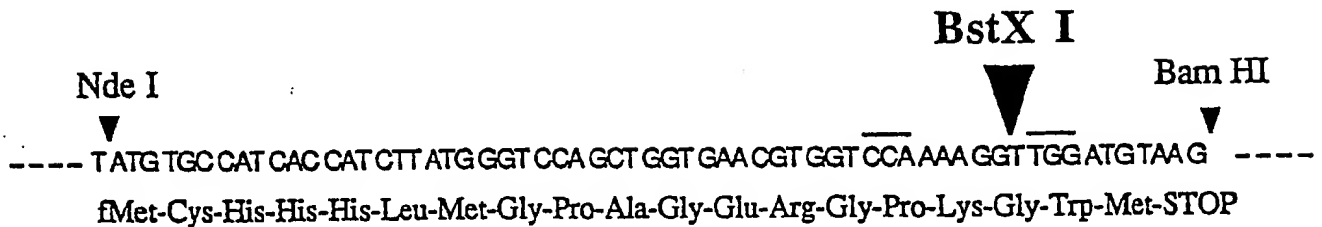
	f Met-Cys		(Gly-X-Y) ₄
	His-His-His		(Gly-X-Y) ₁
	Leu-Met		(Gly-X-Y) _j

La séquence choisie pour le site BstXI est non palindromique et permet ainsi d'orienter les monomères lors de la ligation.

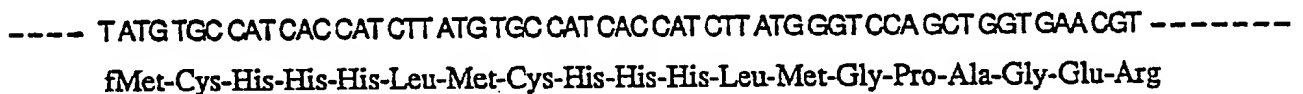
D'autre part, on a toujours un site unique BstXI dans pET après insertion des concatémères car la séquence située à droite des monomères ne permet pas la reconnaissance par BstXI.

FIG. 3

Insertion en Bam HI - Nde I de séquences préparant le vecteur
à accepter des multimères

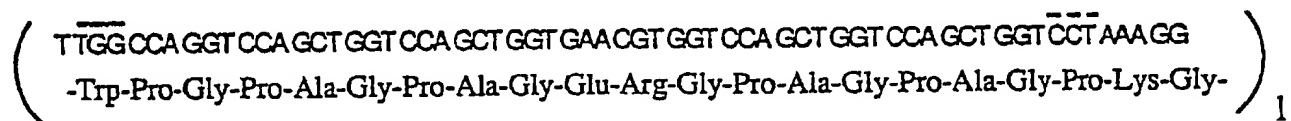


Séquence codant pour 6 Histidines adjacentes, pour améliorer l'affinité du produit d'expression avec la résine Ni-NTA-agarose dans le cas où il se trouverait sous la forme de corps d'inclusion :

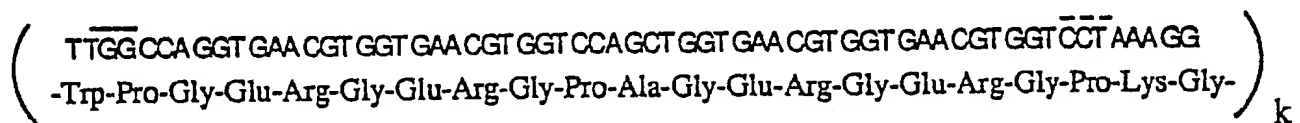


Exemple de séquences concatémères insérées en BstX I

Séquence riche en Gly-Pro-Ala



Séquence riche en Gly-Glu-Arg

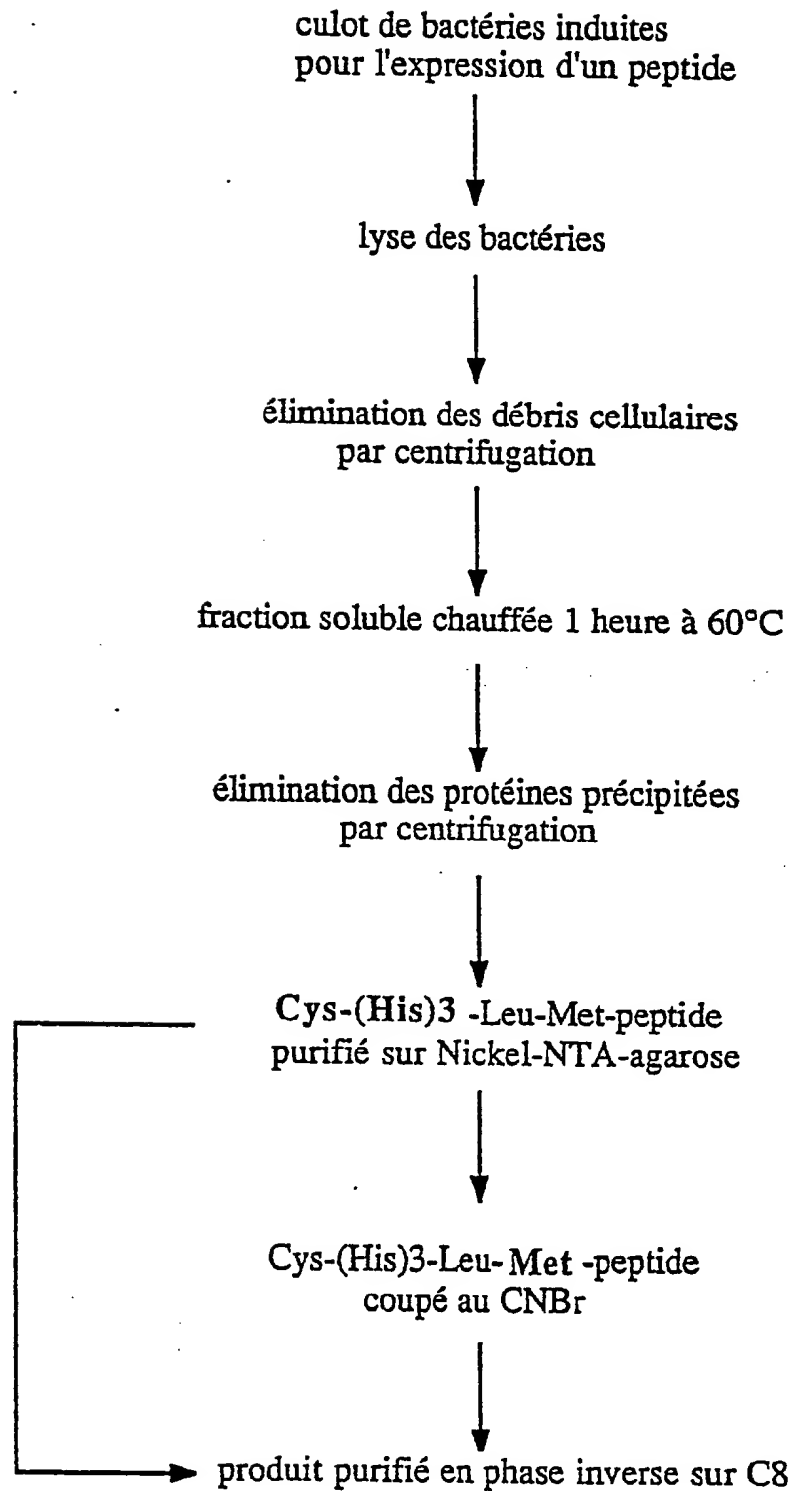


- seul le brin codant de l'ADN est représenté
- en dessous de la séquence nucléotidique est représentée la séquence en acides aminés correspondante
- BstXI est un site de restriction à extrémités cohésives non palindromiques

▼ site de coupure des enzymes de restriction

— séquence reconnue par BstXI

--- séquence modifiée et de ce fait non reconnue par BstXI

FIG. 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9116215
FA 465787
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	GENE. vol. 80, 1989, AMSTERDAM NL pages 305 - 314; INA GOLDBERG ET AL: 'Cloning and expression of a collagen-analog synthetic gene in E. coli' * le document en entier *	1-2, 13
Y	WO-A-9 003 438 (ALLIED-SIGNAL INC.) * le document en entier surtout page 11 et les exemples *	1-2, 13
Y	WO-A-9 005 177 (SYNTRON CORPORATION) * le document en entier plus particulièrement pages 63-74 et les revendications *	1-2, 13
Y	WO-A-8 805 082 (ALLIED CORPORATION) * exemples *	1-2, 13
Y	EP-A-0 282 042 (F. HOFFMANN-LA-ROCHE & CO.) * le document en entier surtout les exemples et les revendications *	1-2, 13
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY vol. 411, 1987, AMSTERDAM; NL. pages 177 - 184; E. HOCHULI ET AL: 'New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues' * le document en entier plus particulièrement page 183 *	1
A	DNA vol. 7, no. 8, 1988, M.A. LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK pages 571 - 577; M. A. HAYDEN ET AL: 'Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides' * l'article en entier plus particulièrement figure 1 et page 576 *	6
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
20 AOUT 1992		LE CORNEC N. D. R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		

2685347

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

**établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche**

FR 9116215
FA 465787
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	METHODS IN ENZYMOLOGY vol. 185, 1990, LONDON; GB. pages 60 - 89; F. W. STODIER ET AL: 'Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes' * le document en entier *	18-20	
	Docket No.: FG0219 US Applicants: Chang et al. U.S. Serial No. 09/710,239 Filing Date: 10 November 2000 Title: RECOMBINANT GELATINS		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		Date d'achèvement de la recherche 20 AOÛT 1992	Examinateur LE CORNEC N.D.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

DERWENT-ACC-NO: 1993-297124
DERWENT-WEEK: 199338
\~4~COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD\~14~
TITLE: Recombinant oligomeric gelatin peptide(s) prodn. - by
culturing E. coli
contg. vectors including expression sequence and specific
selectivity sequence
allowing recovery and purificn.
INVENTOR-NAME: LEFEVRE, J; MEYRUEIS, P ; OBRECHT, G
PRIORITY-DATA: 1991FR-0016215 (December 23, 1991)
PATENT-FAMILY:
PUB-NO PUB-DATE LANGUAGE
PAGES MAIN-IPC
FR 2685347 A1 June 25, 1993 N/A
024 C12P 021/02

INT-CL_(IPC): C07K003/20; C12N015/70 ; C12P021/02
ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2685347A
BASIC-ABSTRACT: Prodn. of peptide oligomers (I) as
substitutes for gelatin
comprises (1) inserting into an intracytoplasmic expression
vector properly
ordered sequences to be expressed consisting of (a) a
specific selectivity
sequence (SSS) allowing subsequent recovery of the expression
product and (b)
expression sequences for a gelatine type peptide; (2) cloning
and expression in
E. coli and (3) recovering the expression product.

Also new are expression vectors contg. such sequences. Pref.
SSS comprises a
component allowing purificn. of the expression product and a
degradation
sequence to provide a pure prod. SSS can be repeated for
improved product
recovery, esp. it comprises one or more codons for His
followed by a codon for
Met, and opt. starts with a Cys codon to permit attachment of
the expression
product to a resin or protein.

USE/ADVANTAGE - (I) can replace gelatin in e.g. foods,
photography, printing,
pharmaceutical and holography and have more uniform

physiochemic al stability,
and homogeneity than natural products. Also (I) can be
modified (by altering
amino acids) to introduce chemically reactive gps. for
specific functions a

----- KWIC -----

DID:

FR 2685347 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)